云 南 植 物 研 究 5(2):207—212, 1983
Acta Botanica Yunnanica

马槟榔甜味蛋白的研究

Ⅰ.提取、纯化和某些特性

胡 忠　何 敏

(中国科学院昆明植物研究所)

提 要

从中药马槟榔(*Capparis masaikai* Lévl.)成熟种子中分离了一种能引起持久甜味的蛋白质,取名为马槟榔甜蛋白(Mabinlin),分子量11,700,等电点pH11.8,在280nm波长有最大吸收峰,其引起甜味感觉的最低浓度为0.1%,种仁含甜蛋白量约4%。

马槟榔(*Capparis masaikai* Lévl.)系白花菜科籐状灌木,分布在广西西南部和云南东南部。其种仁嚼之先有苦、涩味,稍后即有持久性回甜感,为常用中药[1,2]。其化学成分尚未见报道。我们的试验证明,马槟榔种子的甜味是由于一种碱性蛋白质,含量约占干种仁的4%,取名为马槟榔甜蛋白(mabinlin)。本文报告该蛋白的提取、纯化和某些特性。

材 料 与 方 法

1.种子来源

供提取蛋白的马槟榔种子购自中药店和收购站,采摘后均已在室温下存放一年之久。

2.清蛋白提取方法

去壳种子粉碎,过20目筛。种子粉末用石油醚抽提脱脂。脱脂粉末加5—10倍量水于45°C温浸12小时,共三次,布袋过滤,滤液在4°C放置12小时,离心,沉淀物再用水提一次,合并抽提液。抽提液中加硫酸铵至60%饱和度,用氨水调pH7.0,沉淀。离心分离出沉淀,沉淀物用约20倍量水溶解,用透析袋透析脱盐。透析后蛋白质溶液经离心去不溶物,pH约为9。加二倍体积冷丙酮,在低温下沉淀出蛋白质,沉淀物经离心分离,丙酮洗涤和干燥,即为清蛋白固体粗制品。

3.蛋白质和糖的含量测定

本文于1982年1月14日收到。

周俊副研究员提议进行本工作,生理室仪器组协助测定,昆明动物所曹庆娜作等电聚焦电泳,一并致谢。

按常规半微量凯氏定氮法测定固体样品的含氮量。氮含量百分数乘以系数5.71为蛋白质百分含量。蛋白质溶液样品中蛋白质微量测定按Bradford(1976)比色法[3]。0.1ml样品液加5.0ml考马氏亮兰G250试液，以试液为空白，测定反应液在595nm波长的吸收值，以牛血清蛋白为标准样品，计算蛋白质含量。

用酚-硫酸法测定样品的糖含量[4]。样品溶液0.5ml加5%酚溶液0.5ml和浓硫酸2.5ml，以水为空白样品，测定反应液在490nm波长的光密度。以蔗糖为标准样品所作的标准曲线计算样品溶液的含糖量。

4.蛋白质组分的分析

盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳[7]。胶柱0.4×10cm，分离胶浓度15%，pH4.3，电极缓冲液为β-丙氨酸醋酸溶液，pH4.5。电泳电流每管3mA。用考马氏亮兰染色，对色带用CS-910扫描仪在595nm波长扫描，并测出各色带的蛋白质相对含量。

蔗糖梯度等电聚焦电泳法[12]。用110ml等电聚焦柱(LKB-8100)，线性蔗糖密度梯度（50—5%），Ampholine pH3.5—10。由检测器检测洗脱液在280nm波长的光吸收值作出洗脱曲线，测定吸收峰组分洗脱液的pH值，由此得知各蛋白组分的等电点。考虑到甜蛋白的等电点已超过pH11，同时进行了0.1%蛋白质水溶液在不同pH条件下的沉淀试验，溶液不同pH用NaOH调节。

蛋白质的分子量按Weber与Osborn(1969)的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定[11]。盘状电泳，胶柱0.5×10cm，分离胶浓度10%，pH7.1磷酸缓冲系统。标记蛋白质样品为糜蛋白酶(α-Chymotrypsinum)分子量11,000，核糖核酸酶(Ribonuclease)，分子量13,700。同时，也采用Laemmli（1970）的SDS凝胶电泳方法来鉴别蛋白质组分[5]，用Tris-HCl缓冲系统，分离胶浓度15%，考马氏兰染色。

5.纯化方法

羧甲基葡聚糖(CM-Sephadex C-50)离子交换柱层析。层析柱2.5×55cm，用0.05*M*磷酸缓冲液平衡(pH6.2)。粗制清蛋白1g溶于50ml 0.1*M* pH6.2磷酸缓冲液中上柱。用含0.5*M* NaCl和含1*M* NaCl的磷酸缓冲液(0.05*M*，pH6.2)顺序洗脱，洗脱速度36ml/h，每管6ml。根据洗脱液在280nm波长的吸收值及光谱收集各蛋白质组分。

羟基磷灰石柱层析。羟基磷灰石按Siegelman（1965）方法制备[8]。层析柱2.6×7cm，蒸馏水平衡。粗蛋白样品300mg，溶于0.5*M* KH_2PO_4溶液上柱。分别用0.5*M*和1*M* KH_2PO_4溶液顺序洗脱。根据洗脱液在280nm波长的吸收值和光谱收集各蛋白质组分。

各蛋白质组分的洗脱液，经超滤膜超滤浓缩后，在透析袋中用蒸馏水透析。透析后的蛋白质溶液调节pH至等电点，加二倍冷丙酮，沉淀出的蛋白质经分离和干燥后以粉剂保存。

6.甜度鉴定

样品溶液的pH值调节在6—9之间，由试验者二人尝试甜味。样品液滴在舌头的中、后部，数秒后吐出，以凉水漱口，即有甜味感觉。由于该蛋白质甜味与蔗糖不同，后效甚强，故二次尝试之间须多次用水漱口并且相隔半小时。用能引起甜味感觉的蛋白质水溶液的最低浓度表示甜度水平。

结　　果

1.甜味蛋白的提取

马槟榔去壳种子含油量甚高，用石油醚抽取的油脂得率为31%。去壳种子的总蛋白质含量为34%。甜味物质完全包含在清蛋白中。按前述程序所提取的清蛋白粗制品含氮量16.7%，即蛋白质含量为95.3%，制备得率为去壳种子的7.2%。粗制清蛋白中甜味蛋白约占60%，即去壳种子中，甜味蛋白的提取得率约为4%。

2.清蛋白的组分

马槟榔种子清蛋白中酸性蛋白极少。在pH4.3，浓度15%的聚丙烯酰胺凝胶电泳柱上，由正极间负极泳动，分出A、B、C和D四条蛋白质带，它们的相对迁移率依次为0.46，0.51，0.73和0.89（图1），它们的相对含量依次为9%，4%，21%和66%，即组分D最大。

由等电点聚焦电泳的洗脱曲线（图2）可见，按等电点不同，分离出四个蛋白组分，与图1的四个组分相对，顺序应为B、A、C、D，等电点pH值依次为7.10，8.13，11.3，11.8。由于组分C和D的等电点超过Ampholine的pH范围，进行了不同pH条件下，蛋白质溶液的沉淀试验，试验结果（图3）表明，它们的等电点在pH11.4—11.9之间。

马槟榔清蛋白通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳按分子量大小也分离出A、B、C、D四个组分（图4）。按Weber法[11]，用盘状SDS凝胶电泳测定分子量时，组分D未明显分成二个亚基。当以α-糜蛋白酶和核糖核酸酶为标记蛋白，可测得组分D的分子量 1.17×10^4（图5）。

3.纯化

通过羧甲基葡聚糖离子交换柱层析，可以将A、B和C、D组分分离（图6）。但C和D二个组分之间难分开（图1,（2）（3）），它们均为阳离子交换剂强烈吸附，须用1*M* NaCl洗脱。

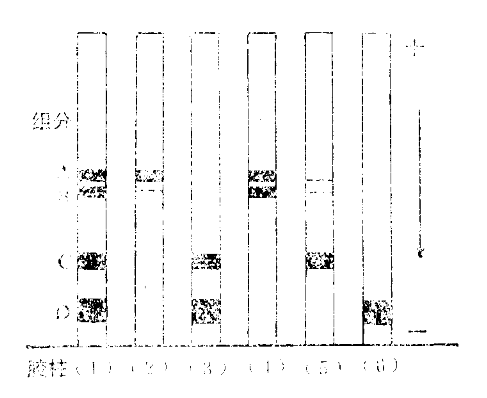


图1　马槟榔种子清蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳图
胶柱（1）粗制品，（2）、（3）参见图6，（4）、（5）、（6）参见图7。

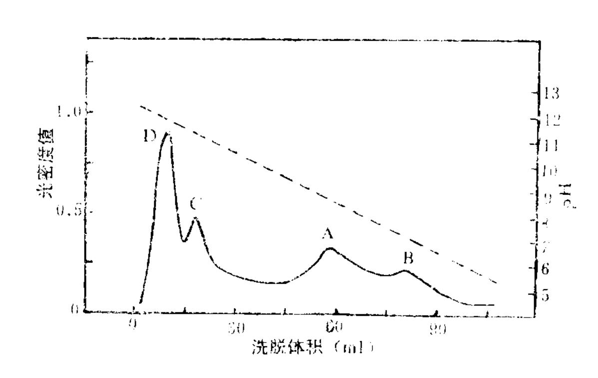


图2　马槟榔种子清蛋白的蔗糖梯度等电聚焦洗脱曲线
——波长280mm吸收曲线，----pH梯度曲线。
组分A、B、C、D与图1相应。

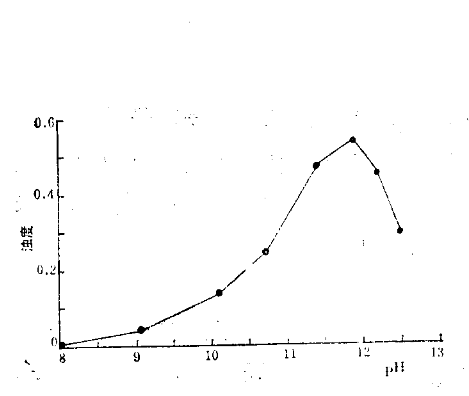


图3　马槟榔清蛋白水溶液在不同pH条件下的混浊度

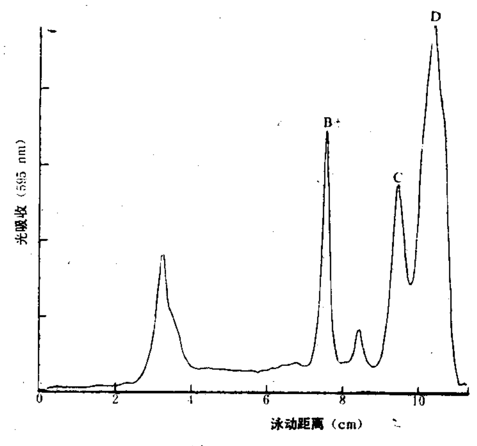


图4　马槟榔清蛋白的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳考马氏兰染色扫描曲线
电泳系统Laemmli（1970）〔5〕

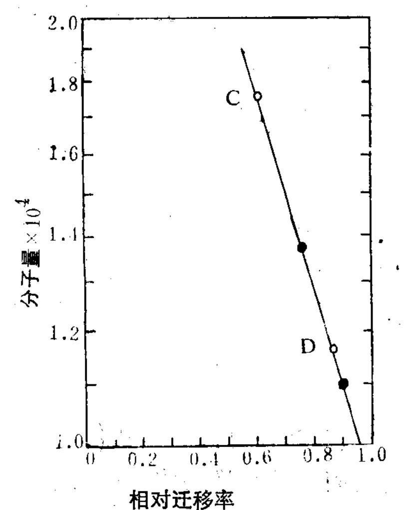


图5　马槟榔清蛋白组分C和D的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳性分子量测定
标记蛋白—●—，α-糜蛋白酶(1.1×10^4)，核糖核酸酶(1.37×10^4)。

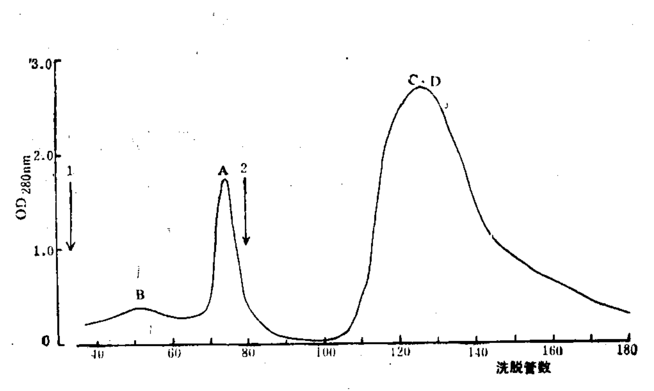


图6 马槟榔清蛋白通过CM-Sephadex C-50柱层析的洗脱曲线
洗脱液：1．0.5MNaCl的磷酸缓冲液；
2．1MNaCl的磷酸缓冲液

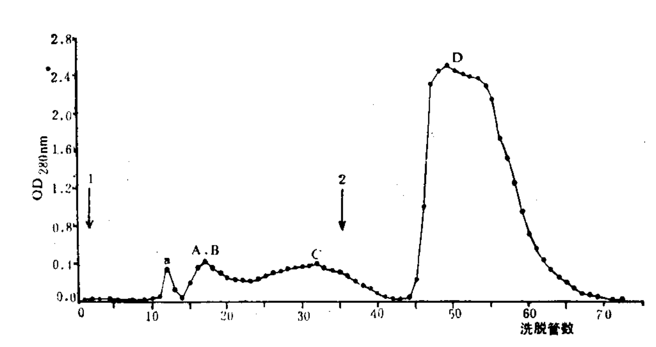


图7　马槟榔清蛋白通过羟基磷灰石柱层析的洗脱曲线
洗脱液：1．0.5MKH_2PO_4溶液；
2．1MKH_2PO_4溶液。组分a为非蛋白质成分。

用羟基磷灰石柱层析，组分C和D能很好地分离（图7，图1（4）（5）（6））。将上述二种层析法结合使用就能将四个组分分别纯化。

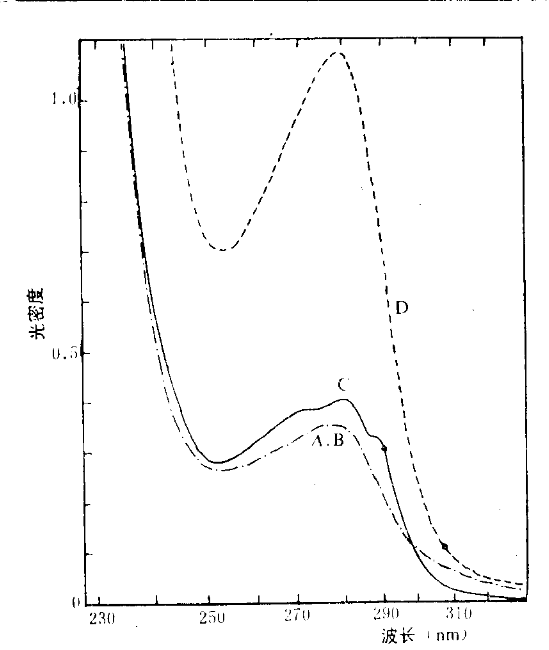


图 8 马槟榔清蛋白经羟基磷灰石柱层析分离的三个组分的吸收光谱
pH6.2。

由图 8 可见这些组分的水溶液在pH 6 时在280nm处有最大吸收峰，组分C在290和269nm处也有吸收峰。这些组分的糖含量测定结果（表 1 ）表明，除了组分 A 外，其他均不是糖蛋白。组分 D 每毫克蛋白质中含糖量低于 7 微克。

4.甜味性质

对纯化的四个清蛋白组分的甜味品评表明，只有组分 D 具有甜味。其引起甜味的性质与种子相同，该蛋白水溶液首先引起暂时的麻的感觉，而后即有甜味，即使蛋白溶液从口中吐出，只要用凉水漱口，也有甜味感觉。用较浓的1%蛋白溶液漱口后，这种甜味作用可维持约半小时。组分 D 引起甜味的最低浓度为 0.1%。我们把组分 D 称为马槟榔甜蛋白 (Mabinlin)。

表 1 马槟榔种子清蛋白通过羟基磷灰石柱层析分离的各组分洗脱液的含糖量*

组　分	糖含量(mg/ml)	蛋白质含量(mg/ml)	每mg蛋白含糖量(mg)
A，B	0.0765	0.552	0.137
C	0.0155	0.412	0.038
D	0.0115	1.55	0.007

* 参见图 7

讨　论

迄今文献中已报道了二种植物性甜味蛋蛋白质，都是从西非洲热带木本植物果实的浆汁中分离出来的。从植物Dioscorephyllum cuminsii得到甜蛋白Monellin (Morris and Cagan 1972, Van del Wel 1972)[6][9]，从植物Thaumatococcus daniellii 得到甜蛋白Thaumatin[10]。我们从马槟榔种子中分离的甜蛋白Mabinlin含量较高，分子量与Monellin (10800)相近，等电点则与Thaumatin (pH12) 相近，其甜味性质都相似，但马槟榔甜蛋白的甜度比前二者均弱得多。

参 考 文 献

〔1〕 中国科学院昆明植物研究所编著，1979年：云南植物志，第二卷，第63—64页，科学出版社。
〔2〕 李时珍，1979年：本草纲目，31卷1845页，人民卫生出版社。
〔3〕 Bradford, M. M. 1976: *Anal. Biochem.*,72: 248—254。

[4] Hodge, J. E. and B. T. Hofreiter. 1962: in R. L. Whister and M. L. Wolfrom ed. Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. 1, Academic Press, New York, P. 388.
[5] Laemmli, U. K. 1970: *Nature*, 227: 680—685.
[6] Morris, J. A and R. H. Cagan. 1972: *Biochem. Biophys. Acta*, 261: 114—122.
[7] Reisfeld, R. A., Lewis, U. J and D. E. Williams. 1962: *Nature*, 195: 281—283.
[8] Siegelman, H. W., Wieczorek and B. C. Turner. 1965: *Anal. Biochem.*, 13, 402—404.
[9] Van der Wel, H. 1972: *FEBS Letters*, 21: 88.
[10] Van der Wel, H and K. Loeve. 1972: *Eur. J. Biochem.*, 31: 221—225.
[11] Weber, K and M. Osborn. 1969: *J. Biol. Chem.*, 244: 4406—4412.
[12] Winter, A and C. Karlson. 1976: LKB Application Note No. 219.

STUDIES ON MABINLIN, A SWEET PROTERN FROM THE SEEDS OF CAPPARIS MASAIKAI LEVL. I. EXTRACTION, PURIFICATION AND CERTAIN CHARACTERISTICS

Hu Zhong and He Min

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica)

Abstract

Capparis masaikai Lévl. with a native name Mabinlang is distributed in Yunnan of China. Its mature seeds are used as chinese medicine and possess sweet taste. The sweet principle has been established to be a basic protein, herein named mabinlin. The protein is extracted from lipid-free seed powder with water at 45°c, and precipitated with 60% saturation of $(NH_4)_2SO_4$ at pH7, and then precipitated with 2 volumes of acetone from the dialyzed aqueous solution of protein. The solid albumin preparation contains 16.5% of N, and its yield is about 7.2% on dry weight of decorticated seeds. It contains four protein components A, B, C, D with relative mobility of 0.46, 0.51, 0.73 and 0.89 respectively in 15% polyacylamide gel electrophoresis (pH 4.3). These compo-nents are separated from each other by using CM-sephadex c-50 column chro-matography and hydroxyapatite column chromatography. Only the component D tastes sweet. Its isoelectric point is about pH 11.8, estimated by using electricfocusing and precipitation of a 0.1% protein solution at different pH. Its molecular weight is about 11700, estimated by using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. No carbohydrate (<7μg/mg protein) could be detected. Its aqueous solution can elicit a persist ent sweet taste, and the lowest concentration eliciting sweet is about 0.1%.